

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PALOMA BONATO

IDENTIFICAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO AO DNA DA PROTEÍNA
NtrX DE *Herbaspirillum seropedicae*

CURITIBA

2009

PALOMA BONATO

IDENTIFICAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO AO DNA DA PROTEÍNA

NtrX DE *Herbaspirillum seropedicae*

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Genética como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Roseli Wassem

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Rose Adele Monteiro

CURITIBA

2009

Ao Valter A. de Baura e à Roseli
Wassem, os quais foram fundamentais
para a realização deste trabalho.
Aos meus pais e ao meu irmão que
sempre estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À orientadora Roseli Wassem, que me acompanhou nestes últimos dois anos e meio, pela paciência, incentivo, apoio durante a execução dos experimentos e pela oportunidade de trabalhar em experimentos tão diferentes durante a minha Iniciação Científica, o que foi muito importante para minha formação acadêmica. Levarei sempre seus ensinamentos comigo.

Ao técnico Valter A. de Baura, profissional muito competente que foi imprescindível para a realização deste trabalho. Obrigada por todo o apoio técnico, pelas discussões e pelas boas risadas.

À co-orientadora Rose Adele Monteiro e à Liu Un Rigo pela oportunidade de trabalhar neste projeto.

À Ana Cláudia Bonatto, que sempre me ajudou muito, pela amizade e por todo o apoio. À Fran, com quem aprendi muito, pelo “ombro amigo” e ajuda. À Poli, companheira de laboratório que esteve ao meu lado durante todo este semestre. Aos demais integrantes do LIPB, Vanessa, Mateus, Paulo, Néelson e Nádia pelos momentos descontraídos.

Ao SEAD. Aos integrantes do Núcleo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica pelo apoio técnico e discussões. Aos integrantes do Laboratório de Polimorfismos, os quais sempre foram muito atenciosos e prestativos.

Às amigas queridas, Ana Clara, Camila Lorenz, Paloma, Pati Soto e Pati gaúcha pelo companheirismo.

À minha família, em especial aos meus pais Alvacir Sebastião Bonato e Marcia Maranhão Bonato e ao meu irmão Murilo por todo apoio, incentivo, compreensão e carinho.

Ao CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria fixadora de nitrogênio endofítica, membro da classe β -Proteobacteria. Recentemente, duas novas proteínas do sistema Ntr foram identificadas neste microrganismo: NtrX e NtrY, as quais são membros da família do sistema de dois componentes. NtrY é uma histidina quinase que fosforila o seu par regulador NtrX em resposta a um sinal metabólico. A proteína NtrX de *H. seropedicae* apresenta 27,1 kDa e contém dois domínios principais: o regulador de resposta, que recebe o sinal de NtrY, e o que contém o motivo hélice-volta-hélice associado com ligação ao DNA, mas não apresenta o domínio de interação com o fator σ^{54} (AAA), comum em proteínas homólogas de outros organismos. NtrX ativa a transcrição de genes envolvidos com o metabolismo de nitrato, mas o mecanismo de ativação e sítio de interação ao DNA não são conhecidos. Ensaio de *footprinting* com DNase I utilizando fragmentos de DNA contendo a região promotora do operon *narXL* marcada com fluoróforos revelaram que a região entre 100 a 180 pares de base da origem de tradução de *narX* foi protegida pela proteína NtrX. Além disso, algumas bandas desta região foram hiper-reativas sugerindo uma distorção do DNA e maior exposição à digestão por DNase. Ensaio de *footprinting* com DNase I utilizando a região promotora de *narXL* marcada com ^{32}P confirmaram os resultados anteriores. Ensaio de retardamento de banda em gel mostraram que a região promotora do operon *narXL* apresenta um sítio de ligação ao fator σ^{70} .

Palavras chave: *Herbaspirillum seropedicae*. NtrX. *Footprinting*.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is an endofitic nitrogen fixing bacteria, member of the β -Proteobacteria class. Recently, two new proteins of the Ntr system were identified in this microorganism: NtrX and NtrY, which are members of the two components system family. NtrY is a histidin kinase that fosforilates its regulator partner NtrX in response to environmental conditions. *H. seropedicae* NtrX protein has 27,1 kDa and contains two major domains: the response regulator, which receives the signal from NtrY, and the helix-turn-helix containing DNA binding domain. NtrX activates transcription of genes involved with nitrate metabolism, but the activation mechanism and DNA binding site are not known. DNase I footprinting with DNA fragments containing the *narXL* promoter region, labeled with fluorophores, revealed that the region between 100 and 180 bases from the *narX* translation start was protected by the NtrX protein. Besides, some bands of this region were hyper-reactive, suggesting DNA distortion and more exposition to DNase digestion. DNase I footprinting with ^{32}P labeled *narXL* template confirmed the results above. Mobility shift assay showed that the promoter region of *narXL* operon contains a putative σ^{70} -dependent promoter.

Key words: *Herbaspirillum seropedicae*. NtrX. Footprinting.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 OBJETIVO GERAL	9
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</i>	10
2.2 METABOLISMO DO NITROGÊNIO	11
2.2.1 <i>Ciclo do nitrogênio</i>	11
2.2.2 <i>Regulação genética geral da fixação de nitrogênio</i>	11
2.2.3 <i>Metabolismo do nitrato</i>	13
2.2.3.1 Nitrato redutase respiratória (NAR)	14
2.2.3.2 Nitrato redutase assimilatória (NAS)	16
2.2.3.3 Nitrato redutase dissimilatória (NAP).....	18
2.2.4 <i>NtrY e NtrX: membros da família de dois componentes</i>	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 ESTIRPE BACTERIANA E PLASMÍDEOS.....	23
3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO	23
3.2.1 <i>Meios de cultura</i>	23
3.2.2 <i>Antibióticos</i>	24
3.2.3 <i>Estoque</i>	24
3.3 MANIPULAÇÃO DE DNA.....	24
3.3.1 <i>Extração de DNA plasmidial</i>	24
3.3.2 <i>Eletroforese em gel de agarose</i>	25
3.3.3 <i>Marcação radioativa dos primers</i>	25
3.3.4 AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	25
3.4 DOSAGEM DE PROTEÍNA.....	26
3.5 ENSAIO DE RETARDAMENTO DE BANDA EM GEL	26
3.6 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE DNASE I	27
3.7 ENSAIO DE <i>FOOTPRINTING</i> COM DNASE I	27
3.8 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA (USB)	27
4 RESULTADOS.....	29
4.1 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE LIGAÇÃO DE NtrX NAS REGIÕES PROMOTORAS <i>narXL</i> , <i>narKnirBDC</i> E <i>narK1K2GHJI</i> DE <i>H. seropedicae</i>	29
4.2 <i>FOOTPRINTING</i> COM DNASE I.....	31
4.3 <i>FOOTPRINTING</i> COM DNASE I UTILIZANDO MARCAÇÃO RADIOATIVA	34
4.4 INTERAÇÃO DE FATORES SIGMA COM A REGIÃO PROMOTORA DE <i>narXL</i>	36
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um fator limitante na produtividade agrícola, criando forte demanda no uso de fertilizantes nitrogenados. Contudo, fertilizantes químicos causam sérios problemas ambientais, como aumento na emissão de óxidos de nitrogênio, acidificação do solo e eutrofização da água. Com isso, a fixação biológica do nitrogênio, conversão de nitrogênio atmosférico a amônia por bactérias diazotróficas (capazes de fixar nitrogênio), é um processo de grande importância para o ambiente e para a agricultura. Nas últimas décadas, estudos em genética e bioquímica da fixação biológica do nitrogênio fizeram grandes progressos, contudo, mais estudos sobre o processo são necessários para que este possa ser mais amplamente aplicado (DIXON; KAHN, 2004; CHENG, 2008).

Eucariotos não apresentam a capacidade de fixar nitrogênio. Por outro lado organismos fixadores de nitrogênio são encontrados em vários grupos filogenéticos do domínio Bacteria e Archaea (DIXON; KAHN, 2004). *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria fixadora de nitrogênio endofítica que se associa com muitas gramíneas, como milho, sorgo, cana de açúcar e arroz (BALDANI *et al.*, 1986; OLIVARES *et al.*, 1996).

A fixação biológica do nitrogênio requer grande quantidade de energia e, conseqüentemente, é fortemente regulada, tanto a nível transcricional quanto pós-traducional. Nas enterobactérias, o sistema regulatório de nitrogênio (*ntr*), que controla a expressão de genes envolvidos com a fixação de nitrogênio, é composto por sete proteínas: o sistema de dois componentes, NtrC e NtrB; as proteínas PII, GlnB e GlnK; e as enzimas GlnD, GlnE e glutamina sintetase. Posteriormente, foram identificados mais dois membros deste sistema, NtrY e NtrX, que foram parcialmente caracterizados em *Azorhizobium caulinodans*, *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* (PAWLOWSKI; KLOSSE; BRUIJN, 1991; ISHIDA *et al.*, 2002; GENOPAR).

O operon *ntrYX* de *H. seropedicae* não está envolvido com a regulação da fixação de nitrogênio, como em *A. caulinodans*, mas está relacionado com a regulação do metabolismo de nitrato (PAWLOWSKI; KLOSSE; BRUIJN, 1991; ALVES, 2006). O nitrato presente no meio pode ser metabolizado pelas bactérias

por três vias diferentes: a respiratória, onde o nitrato é aceitor final de elétrons, a assimilatória, na qual nitrato é reduzido a amônio, e dissimilatória, onde nitrato atua no balanço redox (RICHARDSON *et al.*, 2001). *H. seropedicae* apresenta a via respiratória, codificada pelos genes *nar*, e a assimilatória, codificada pelos genes *nas* (GENOPAR).

As proteínas NtrX e NtrY de *H. seropedicae* foram recentemente caracterizadas. NtrY é uma proteína sensora que sinaliza a ocorrência de alterações via fosforilação ao seu par sensor, NtrX, que regula a transcrição de genes alvo. NtrY é uma proteína de membrana que apresenta três domínios principais: o N-terminal, com quatro hélices transmembrana, o central que engloba as regiões HAMP, PAS e HisKa e o domínio C-terminal, com a região HATPaseC responsável por atividade de fosfotransferência e de ATPase. A região HAMP é um motivo estrutural encontrado em proteínas transmembrana, geralmente conectando o domínio sensor externo com o interno, transdutor de sinal (ARAVIND; PONTIG, 1999). A região PAS é frequentemente observada em proteínas sensoras de oxigênio, luz, potencial redox e age através de interação com cofatores ou proteínas alvo (TAYLOR; ZHULIN, 1999). A região HisKA é fosfoacceptora e também está envolvida com dimerização da proteína que o contém (SZURMANT; WHITE; HOCK, 2007). NtrX, por outro lado, apresenta apenas dois domínios: N-terminal e C-terminal. No N-terminal, há presença da região REC que recebe o sinal de seu par sensor através de fosforilação, e no C-terminal, NtrX possui o motivo hélice-volta-hélice (HTH), envolvido com ligação ao DNA (ALVES, 2004).

Osaki (2009) demonstrou que NtrX de *H. seropedicae* está envolvida na regulação da expressão de três operons, que incluem genes envolvidos com o metabolismo do nitrato: *narXL*, *narKnirBDC* e *narK1K2GHJI*. Neste trabalho ensaios de *footprinting* foram conduzidos com o objetivo de elucidar os sítios de interação da proteína regulatória NtrX na região promotora dos operons *narXL*, *narKnirBDC* e *narK1K2GHJI*, permitindo um melhor entendimento do mecanismo de ativação de NtrX.

1.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o sítio de interação da proteína NtrX nas regiões promotoras dos operons *narXL*, *narKnirBDC* e *narK1K2GHJI*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar ensaio de *footprinting* com DNase I utilizando como sonda os fragmentos das regiões promotoras marcadas com fluoróforos e a proteína NtrX purificada.
- Identificar as regiões protegidas pela proteína NtrX nestas regiões promotoras.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae, bactéria gram-negativa, membro da classe β -Proteobacteria, é um diazotrofo e endofítico obrigatório que se associa não patogenicamente com a raiz e as partes aéreas de muitas gramíneas, como milho, sorgo, cana de açúcar e arroz (BALDANI *et al.*, 1986; OLIVARES *et al.*, 1996). Além disso, já foi isolado de plantas tropicais como bananeira e abacaxizeiro (CRUZ *et al.*, 2001).

Os primeiros isolados do gênero *Herbaspirillum* foram inicialmente descritos como sendo uma quarta espécie do gênero *Azospirillum* (BALDANI *et al.*, 1984). Entretanto, Falk e colaboradores (1986) através de experimentos de hibridização RNA-RNA mostraram que estes isolados não têm relação próxima com os gêneros *Azospirillum* ou *Aquaspirillum*. Com isso, Baldani e colaboradores (1986) definiram a primeira espécie do novo gênero: *Herbaspirillum seropedicae*.

As células deste microrganismo são vibrióides (bastonetes curvos) e, na presença de oxigênio, móveis. Em geral, apresentam dois flagelos polares. A temperatura ótima para crescimento dependente de nitrogênio gasoso é de 34°C e a faixa de pH entre 5,3 e 8,0 (BALDANI *et al.*, 1986; KLASSEN *et al.*, 1997).

H. seropedicae invade seus hospedeiros através de fendas nas junções das raízes laterais com a raiz principal. Após sua entrada, a bactéria coloniza os espaços intercelulares das raízes e se distribui para o córtex, células endodérmicas e vasos de xilema, através dos quais se difunde para toda a planta, inclusive para as partes aéreas. No interior dos tecidos vegetais *H. seropedicae* também é capaz de fixar nitrogênio (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003).

2.2 METABOLISMO DO NITROGÊNIO

2.2.1 Ciclo do nitrogênio

O nitrogênio é um dos elementos químicos mais importantes para vida, já que é necessário para a produção de aminoácidos e nucleotídeos, dentre outras moléculas.

Os principais processos do ciclo global do nitrogênio são realizados por bactérias e envolvem várias reações de óxido redução. Na fixação biológica, nitrogênio gasoso é convertido a amônia, através do complexo enzimático nitrogenase. Os organismos que tem esta capacidade são chamados de diazotrofos, os quais são capazes de crescer tendo como única fonte o nitrogênio atmosférico (DIXON; KAHN, 2004). A amônia produzida pela fixação biológica do nitrogênio é convertida a amônio, o qual é incorporado a outras biomoléculas através de duas vias principais.

Em enterobactérias, a via mais importante para a incorporação de nitrogênio é a glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT). A glutamina sintase (GS), codificada pelo gene *glnA*, é uma enzima multimérica composta por 12 subunidades idênticas, que catalisa a conversão de glutamato e amônia em glutamina. Já a enzima GOGAT converte uma glutamina em duas moléculas de glutamato, através de adição de um grupo amina em α -cetoglutarato. O produto do gene *glnE* (GlnE) regula a atividade de GS através de adenililação, adicionando um grupo AMP em cada subunidade, o que torna a enzima inativa. Isto ocorre em resposta a altas concentrações de amônio intracelular (MERRICK; EDWARDS, 1995).

O amônio pode ser ainda convertido a nitrato durante o processo de nitrificação, enquanto que na denitrificação o nitrogênio gasoso retorna ao ambiente através da conversão de nitrato a nitrito e óxidos de nitrito (KLOTZ; STEIN, 2008) (FIGURA 1).

2.2.2 Regulação genética geral da fixação de nitrogênio

Como a redução de nitrogênio atmosférico a amônia requer alto gasto energético, a fixação biológica de nitrogênio é altamente regulada, principalmente a nível transcricional, tanto em resposta ao nível de nitrogênio fixado disponível, como

ao nível de oxigênio, o qual causa danos ao funcionamento da nitrogenase (DIXON; KAHN, 2004).

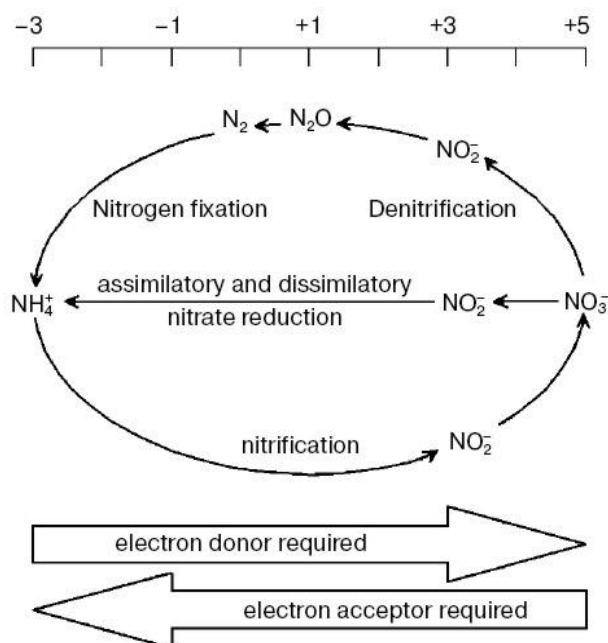


FIGURA 1 - CICLO BIOGEOQUÍMICO DO NITROGÊNIO

Os estados de oxidação dos intermediários do ciclo do nitrogênio estão indicados na parte superior da figura. FONTE: Morozkina e Zvyagilskaya (2007).

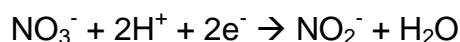
A transcrição dos genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio, ou genes *nif*, é dependente do fator sigma alternativo σ^{54} e da proteína NifA (DIXON; KAHN, 2004), cuja transcrição, por sua vez, é dependente de uma cascata de proteínas regulatórias, conhecida como sistema regulatório de nitrogênio ou *ntr*. Em enterobactérias, o sistema *ntr* é composto por sete proteínas: o sistema de dois componentes, NtrC e NtrB; as proteínas PII, GlnB e GlnK; e as enzimas GlnD, GlnE e glutamina sintetase (GS) (MERRICK; EDWARDS, 1995). Posteriormente, mais duas proteínas deste sistema foram identificadas: NtrX e NtrY, as quais, como NtrC e NtrB, também são membros do sistema de dois componentes (PAWLOWSKI; KLOSSE; BRUIJN, 1991).

As proteínas PII, GlnB e GlnK, são sujeitas a modificação covalente catalisada por uma uridililtransferase, codificada pelo gene *glnD*. Sob condições de limitação de nitrogênio, a uridililtransferase uridilila GlnB e GlnK, as quais nesta forma se ligam na proteína NtrB ativando sua atividade quinase, que fosforila a proteína reguladora de resposta, NtrC. Na forma fosforilada, NtrC interage com a

RNA polimerase σ^{54} , estimulando a transcrição de vários genes envolvidos com a fixação de nitrogênio e metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio. Em altas concentrações de nitrogênio, GlnB e GlnK são de-uridililadas estimulando a atividade fosfatase de NtrB, inativando NtrC pela remoção do fosfato (DIXON; KAHN, 2004).

2.2.3 Metabolismo do nitrato

Muitos organismos utilizam nitrato como fonte de nitrogênio. A primeira fase desse processo de assimilação envolve a redução de nitrato a nitrito catalisada pela enzima nitrato redutase (RICHARDSON *et al.*, 2001), conforme a reação a seguir:



Em bactérias há três diferentes classes de sistemas de redução de nitrato, que variam quanto à localização celular, estrutura, propriedades bioquímicas, regulação e organização de genes. A nitrato redutase assimilatória citoplasmática (NAS) permite a utilização de nitrato como fonte de nitrogênio para crescimento (assimilação de nitrato). A nitrato redutase respiratória ligada à membrana (NAR) produz energia metabólica através da utilização do nitrato comoceptor final de elétrons e geração de gradiente de prótons através da membrana, o que dirige a formação de ATP (respiração de nitrato). Já a nitrato redutase dissimilatória periplasmática (NAP) dissipa o excesso de energia redutora para manter o balanço redox (dissimilação de nitrato) (MOROZKINA; ZVYAGILSKAYA, 2007; MORENO-VIVIÁN *et al.*, 1999).

Análises de genomas de procariotos mostram que as três diferentes nitrato redutases são filogeneticamente muito difundidas (RICHARDSON *et al.*, 2001). Entretanto, todas as nitrato redutases bacterianas estudadas pertencem à família do dimetil sulfóxido (DMSO) redutase. O sítio ativo das enzimas desta família contém como cofator, dois grupos molibdopterina guanina dinucleotídeo (MGD) coordenados a um átomo de molibdênio.

2.2.3.1 Nitrato redutase respiratória (NAR)

A nitrato redutase respiratória é bem difundida entre as enterobactérias e muito estudada em *Escherichia coli*. A enzima, codificada pelo operon *narGHJI*, é heterotrimérica, consistindo das subunidades α , β e γ . A subunidade β (58 kDa), codificada pelo gene *narH*, é uma proteína globular capaz de transferir elétrons para a subunidade catalítica α (139 kDa), produto do gene *narG*, que apresenta o centro [4Fe-4S] e um cofator molibdênio, sítio da redução de nitrato. A subunidade γ (26 kDa), codificada pelo gene *narI*, é uma proteína transmembrana com um grupo heme, que ancora as subunidades α e β no lado citoplasmático da membrana celular (BLASCO *et al.*, 2001) (FIGURA 2). O produto do gene *narJ* (NarJ) é uma chaperona envolvida na montagem do complexo da nitrato redutase na membrana, através de inserção do cofator molibdênio em NarG (LIU; DEMOSS, 1997; BLASCO *et al.*, 1998).

A subunidade γ recebe elétrons da ubiquinona e os transfere para a subunidade β através do grupo heme. A oxidação de ubiquinona no lado periplasmático da membrana interna e o lançamento de dois prótons no compartimento periplasmático leva a formação de um gradiente de próton transmembrana, que dirige a formação de ATP (revisto por PHILIPPOT; HOJBERG, 1999).

Como o sítio ativo de NarGHI (subunidade α) está localizado no citoplasma, o nitrato deve ser transportado para dentro da célula para ser reduzido. Esta função é desempenhada por NarK, proteína transmembrana membro da superfamília dos facilitadores principais (MFS). Os membros desta família são subdivididos em dois tipos. O tipo 1 realiza simporte nitrato/próton e o tipo 2 antiporte nitrato/nitrito (MARGER; SAIER, 1993; MOIR; WOOD, 2001).

Em *E. coli*, o gene *narK* está situado à montante dos genes que codificam para a nitrato redutase respiratória (*narKGHJI*). Sua expressão é induzida por nitrato, nitrito, Fnr (ativa na ausência de oxigênio) e NarL (NOJI *et al.*, 1989; SELF *et al.*, 1999). A montante de *narK* são encontrados os genes que codificam para o sistema de dois componentes NarXL (*narXL*), que regulam o operon *narKGHJI* e o próprio operon. A expressão do operon *narXL* é induzida pela proteína ModE (sensora de molibdênio), por nitrato e nitrito. Outro par regulatório da família de dois

componentes, NarQP, também está envolvido na indução dos operons *narXL* e *narK*. Os sensores NarX e NarQ interagem diretamente com nitrato ou nitrito, se autofosforilam e transferem o fosfato para as proteínas NarP e NarL, ativando-as. A diferente organização de sítios de ligação de NarL e NarP nos genes alvo, bem como diferente atividade dos sensores permite a discriminação entre nitrito e nitrato e promove uma resposta específica (RABIN; STEWART, 1993; DARWIN; STEWART, 1995).

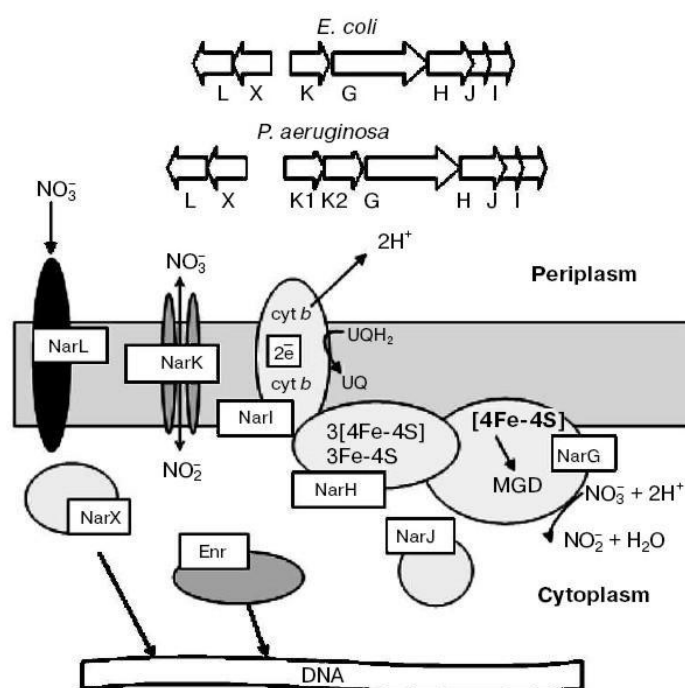


FIGURA 2 - ESTRUTURA DA NITRATO REDUTASE RESPIRATÓRIA DE *E. coli*

A parte superior da figura ilustra a organização dos genes estruturais e regulatórios das nitrato redutase respiratórias de *E. coli* e *P. aeruginosa*. FONTE: Morozkina e Zvyagilskaya (2007).

A região intergênica entre *narK* e *narXL* contém as regiões controladoras dos dois operons, as quais podem se sobrepor, especialmente porque o padrão de regulação de ambos é muito semelhante. Os níveis de expressão basais de *narK* são semelhantes nas condições aeróbica e anaeróbica, entretanto, a indução por nitrato é reduzida de modo significativo durante a aerobiose. Fnr liga-se na região intergênica de *narK* e *narX*, mas parece ativar apenas o promotor de *narK* (DARWIN; STEWART, 1995).

Pseudomonas aeruginosa apresenta dois genes *narK*, ambos à montante dos genes estruturais de NarGHJI (*narK1K2GHJI*). Entretanto, apenas um deles está

envolvido com o metabolismo de nitrato/nitrito em condições denitrificantes (SHARMA; NORIEGA; ROWE, 2006).

H. seropedicae, diferente de *E. coli* e de *P. aeruginosa*, contém três genes *narK* em seu genoma (*narK*, *narK1* e *narK2*), e não apresenta os genes *narQ* e *narP*. Entretanto, de forma geral, os genes estruturais e regulatórios da nitrato redutase respiratória das três espécies são muito semelhantes em estrutura e organização (FIGURA 2). Em *H. seropedicae* estes genes estão distribuídos em três operons: operon *narK1K2GHJI*, o terceiro *narK* à montante do operon da nitrito redutase respiratória (*narKnirBDC*) e o operon *narXL* (ALVES, 2006).

2.2.3.2 Nitrato redutase assimilatória (NAS)

Baseado na estrutura do cofator, que atua como doador de elétrons, é possível distinguir dois tipos de nitrato redutase assimilatória: NAS dependente de ferredoxina/flavodoxina e NAS dependente de NADH. Ambos os tipos contêm um cluster ferro-enxofre N-terminal, mas não possuem grupos heme (MORENO-VIVIÁN *et al.*, 1999; MOROZKINA; ZVYAGILSKAYA, 2007).

As nitrato redutases assimilatórias dependentes de ferredoxina/flavodoxina apresentam em seu núcleo ativo centros [Fe-S], mas são desprovidas de FAD e citocromos (RUBIO *et al.*, 1999). As nitrato redutases de *Azotobacter vinelandii* e *Plectonema boryanum* consistem em uma subunidade única com um centro [4Fe-4S] e utilizam flavodoxina como doadora de elétrons (MIKAMI; IDA, 1984) (FIGURA 3).

H. seropedicae apresenta uma nitrato redutase dependente de NADH (GENOPAR) muito semelhante à de *Klebsiella oxytoca*. Neste membro da família Enterobacteriaceae, a nitrato redutase é codificada pelos genes *nasCBA* e consiste em duas subunidades. A subunidade catalítica NasA (92kDa) liga-se a bis-MGD e apresenta um domínio N-terminal [4Fe4S] e um domínio C-terminal [2Fe2S]. A segunda subunidade, NasC (45kDa), contém o cofator FAD e transfere elétrons de NAD(P)H para NasA. NasB (104kDa) codifica para uma nitrito redutase com domínio siro-heme (LIN; GOLDMAN; STEWART, 1993; 1994) (FIGURA 3).

Os genes *nasFED* de *K. oxytoca* codificam para um transportador periplasmático de nitrato e nitrito, membro da família de transportadores ABC, os

quais são dependentes da energia da hidrólise de ATP. NasF é uma proteína periplasmática, NasE é um homodímero que se estende através da membrana e NasD é uma ATPase associada à membrana (WU; STEWART, 1998) (FIGURA 3).

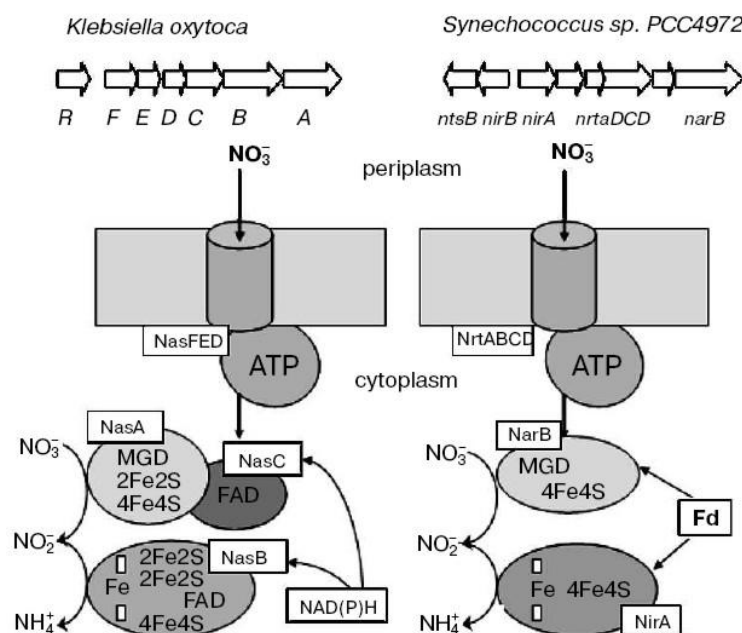


FIGURA 3 - ESTRUTURA DAS NITRATO REDUTASES ASSIMILATÓRIAS

A nitrato redutase de *K. oxytoca* é dependente de NADH e a de PCC4972, é dependente de flavodoxina. Na parte superior da figura são mostrados esquemas da organização dos genes da nitrato redutase assimilatória de ambos microrganismos. FONTE: Morozkina e Zvyagilskaya (2007).

A organização dos genes de transporte de nitrato de *H. seropedicae* é semelhante à de *K. oxytoca*: em ambas as bactérias eles formam um operon à montante dos genes estruturais da nitrato redutase assimilatória (*nasFEDCBA*) (GENOPAR).

O nitrato deve ser transportado para dentro da célula através de NasFED e é reduzido a nitrito, o qual, por sua vez, é reduzido a amônio, por NasBA e NasC, respectivamente. Amônio é convertido em formas metabolizáveis pela célula através das enzimas glutamina sintetase e GOGAT (MORENO-VIVIÁN *et al.*, 1999; RICHARDSON *et al.*, 2001).

Em enterobactérias, o nível de transcrição dos genes *nas* está sob controle duplo: repressão por amônio via sistema geral de regulação de nitrogênio (Ntr) e indução por nitrato e nitrito (LIN; STEWART, 1996; WU *et al.*, 1999). Na ausência de nitrato/nitrito, um terminador de transcrição à montante de *nasF* previne a

transcrição dos genes do operon *nasFEDCBA*. Quando nitrato e nitrito estão presentes, NasR promove a antiterminação de transcrição, aumentando a expressão do operon (GOLDMAN, LIN e STEWART, 1994; LIN; STEWART, 1996).

Na bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis* os genes que codificam para os componentes da nitrato redutase assimilatória estão organizados no operon *nasABCDEF*. O gene *nasB* codifica para a subunidade de transferência de elétrons e o *nasC* para a subunidade catalítica. O gene *nasA* codifica para um transportador de nitrato. Já os genes *nasDE* codificam para a nitrito redutase e *nasF* para uma metiltransferase (OGAWA *et al.*, 1995). A expressão de *nasBC* é regulada pelo controle de nitrogênio global, sendo pouco expressos em células crescidas em meio de cultura com amônio ou glutamina como fonte de nitrogênio (NAKANO *et al.*, 1995). A transcrição de *nasDE* é induzida sob condições de excesso de nitrogênio e em limitações de oxigênio através do sistema de dois componentes ResDE (NAKANO *et al.*, 1998).

2.2.3.3 Nitrato redutase dissimilatória (NAP)

A nitrato redutase dissimilatória, localizada no periplasma na forma de heterodímeros, é codificada pelo operon *napFEAGHBC*. Acredita-se que a redução de nitrato através desta enzima tem um papel importante na denitrificação aeróbia em *Pseudomonas* sp. e *Paracoccus pantotrophus*, na adaptação ao crescimento sob condições de anaerobiose em *Ralstonia eutropha*, na manutenção do equilíbrio redox sob uso de nitrato como acceptor de elétrons para remoção de energia redutora em *Thiosphaeravou*, dentre outras funções (revisto por MOROZKINA; ZVYAGILSKAYA, 2007).

O nitrito gerado pela Nap pode ser utilizado como fonte de nitrogênio ou como substrato para respiração anaeróbica de acordo com o organismo, embora a enzima não pareça estar primariamente envolvida em nenhuma destas funções (MORENO-VIVIÁN *et al.*, 1999).

Esta nitrato redutase é amplamente difundida entre as bactérias gram-negativas, mas não está presente em *H. seropedicae* (GENOPAR).

2.2.4 NtrY e NtrX: membros da família de dois componentes

Para um microrganismo explorar com sucesso as mudanças ambientais é fundamental que reconheça sinais de variação para que possa rapidamente adaptar o seu perfil de expressão gênica. Sistemas de transdução de sinais são responsáveis por sensoriar sinais e transmitir a informação, permitindo respostas adaptativas específicas (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000; WEST; STOCK, 2001; SZURMANT; WHITE; HOCH, 2007).

Um dos maiores grupos de proteínas transdutoras de sinais é composto por pares de proteínas, denominado sistemas de dois componentes, onde um dos membros é sensor e o outro, efetor. Os sistemas de dois componentes são encontrados em organismos de todos os domínios (Eubacteria, Archaea e Eucarya), mas é nas eubactérias, onde constituem cerca de 1% das proteínas codificadas, que atingem a maioria das principais vias de sinalização, atuando na regulação de diversos processos como quimiotaxia, osmoregulação, metabolismo e transporte (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000; WEST; STOCK, 2001).

Os sistemas de dois componentes típicos são compostos por duas proteínas: uma histidina quinase sensora (HK), que monitora estímulos externos e transmite esta informação ao seu par, a proteína reguladora de resposta (RR) através de fosforilação. A reação de fosfotransferência ocorre em três etapas: (1) um grupo fosforil é transferido a partir de ATP a um resíduo de histidina conservado de HK. (2) A HK catalisa a transferência deste grupo fosforil para um resíduo aspartato conservado no domínio regulatório da RR. (3) O grupo fosforil é removido do resíduo fosfo-aspartato através de uma reação de hidrólise catalisada pela HK (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000).

A maioria das histidinas quinases são transmembrana, o que permite a detecção direta de sinais extracelulares. O domínio sensor é altamente variável, enquanto que o domínio catalítico da proteína na porção C-terminal, que é responsável pela ligação ao ATP, e o domínio contendo a histidina fosforilável são altamente conservados em sequência e estrutura (WEST; STOCK, 2001; SZURMANT; WHITE; HOCH, 2007).

As proteínas reguladoras de resposta normalmente apresentam dois domínios: um domínio N-terminal regulatório e um domínio C-terminal efetor que

apresenta sequência variável e, em geral, tem atividade de ligação ao DNA, ativando e reprimindo a transcrição de genes específicos (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000).

As proteínas NtrY e NtrX são pertencentes à família de proteínas de dois componentes: NtrY é a proteína sensora e NtrX, a reguladora de resposta. Elas foram identificadas em algumas bactérias fixadoras de nitrogênio, como *Azorhizobium caulinodans* (PAWLOWSKI; KLOSSE; BRUIJN, 1991), *Mesorhizobium loti* (KANEKO *et al.*, 2000), *Sinorhizobium meliloti* (CAPELA *et al.*, 2001), *Azospirillum brasilense* (ISHIDA *et al.*, 2002) e *Herbaspirillum seropedicae* (GENOPAR), e em outras bactérias, como *Caulobacter crescentus* (NIERMAN *et al.*, 2001) e *Neisseria meningitidis* (TETTELIN *et al.*, 2000).

Em *Azorhizobium caulinodans*, as proteínas NtrY e NtrX estão aparentemente envolvidas na fixação de nitrogênio já que mutantes *ntrYX* apresentam redução de 20 a 50% na atividade de nitrogenase. Mutantes *ntrYX* apresentam crescimento diminuído na presença de nitrato como única fonte de nitrogênio indicando que estas proteínas também estão envolvidas no metabolismo de nitrato. NtrY (84,26kDa) contém duas possíveis regiões transmembrana enquanto que NtrX (50,2kDa) apresenta alta similaridade com proteínas NtrC de diversos organismos. É possível que o par NtrY/X interaja com o par NtrB/C para ativar a transcrição de promotores dependentes do sistema *ntr*. À montante de *ntrYX* há um promotor do tipo σ^{54} (PAWLOWSKI; KLOSSE; BRUIJN, 1991).

NtrY de *Azospirillum brasilense* apresenta quatro regiões hidrofóbicas na região N-terminal que provavelmente são regiões transmembrana. Já a proteína NtrX desta espécie possui três domínios: o domínio catalítico, o de interação com a RNA polimerase σ^{54} (AAA) e o motivo de ligação ao DNA, hélice-volta-hélice. Possivelmente é um ativador transcricional de vias de assimilação de nitrato em *A. brasilense*. À montante do operon *ntrYX* há um promotor do tipo σ^{70} (ISHIDA *et al.*, 2002).

As proteínas NtrY e NtrX de *H. seropedicae* não estão envolvidas com a fixação de nitrogênio, mas são essenciais para o metabolismo de nitrato (ALVES, 2004; 2006). A proteína NtrY desta espécie, com massa molecular aproximada de 79,7kDa (sem o peptídeo sinal de 26 aminoácidos) apresenta três regiões. A região N-terminal, com quatro possíveis regiões transmembrana, a central com três

domínios: HAMP, PAS e HisKA e a C-terminal que possui o domínio HATPaseC (ALVES, 2004), responsável pela fosfotransferência e com atividade ATPase (SZURMANT; WHITE; HOCK, 2007). Domínios HAMP são comuns em proteínas sinalizadoras de procariotos onde parecem atuar como sensores de mudanças conformacionais e inibidores de sinalização histidina quinase constitutiva (ARAVIND; PONTIG, 1999). Domínios PAS estão envolvidos em perceber oxigênio, potencial redox, luz dentre outros estímulos, associado a cofatores (TAYLOR; ZHULIN, 1999), e é no domínio HisKa (His quinase A) onde ocorre autofosforilação de proteínas sensoras (SZURMANT; WHITE; HOCK, 2007).

Já a proteína NtrX de *H. seropedicae*, com massa molecular aproximada de 27,1kDa, contém duas regiões: a N-terminal, com o domínio regulador de resposta (REC) que recebe o sinal de seu par sensor (NtrY) e a C-terminal, com o motivo hélice-volta-hélice, relacionado com ligação ao DNA. Ao contrário de NtrX de *A. brasilense* (ISHIDA *et al.*, 2002), não apresenta o domínio AAA (ATPase associada a atividades celulares), que interage com o fator σ^{54} da RNA polimerase. Isso sugere que NtrX é ativador de outro fator sigma (ALVES, 2004). Na posição 52, apresenta um aminoácido aspartato conservado que é provavelmente fosforilado por NtrY (OSAKI, 2009).

À montante de *ntrYX* de *H. seropedicae* existem duas possíveis regiões promotoras. A mais provável delas é a mais próxima de *ntrY*, com dois sítios para o fator σ^{54} , por apresentar expressão significativa. Nitrato e NtrC ativam a transcrição desta região, enquanto que molibdênio e oxigênio não parecem afetar diretamente a sua expressão (ALVES, 2006).

Ensaio de β -galactosidase realizados por Alves (2006) mostraram que NtrY é requerida para total expressão do operon envolvido com a assimilação de nitrato, *nasFEDCBA*, e de dois operons relacionados à respiração de nitrato, *narXL* e *narKnirBDC* de *H. seropedicae*. À montante tanto de *nasFEDCBA* como de *narXL* foi encontrado um sítio de ligação para a proteína NtrC. Molibdênio e oxigênio não exercem efeito direto sobre a expressão destes operons. Além disso, à montante de *narXL* também há um sítio de ligação para NarL. Já a expressão de *narKnirBDC* atinge nível máximo de expressão em microaerofilia e na presença de molibdênio. Em sua região regulatória foram encontrados sítios de ligação para as proteínas NtrC, Fnr e ModE.

Osaki (2009) demonstrou através de ensaios de retardamento em gel que NtrX está envolvida na regulação da expressão dos três operons envolvidos com o metabolismo do nitrato de *H. seropedicae*: *narXL*, *narKnirBDC* e *narK1K2GHJI*. Quando fosforilada, NtrX apresenta maior afinidade a essas regiões. Possivelmente, a fosforilação de NtrX leva a uma mudança conformacional que expõe o domínio HTH, aumentando a ligação de NtrX ao DNA (OSAKI, 2009).

Estes resultados de Osaki (2009) e Alves (2006) levaram a proposição de um modelo da cascata regulatória dos genes do metabolismo de nitrato em *H. seropedicae* (FIGURA 4).

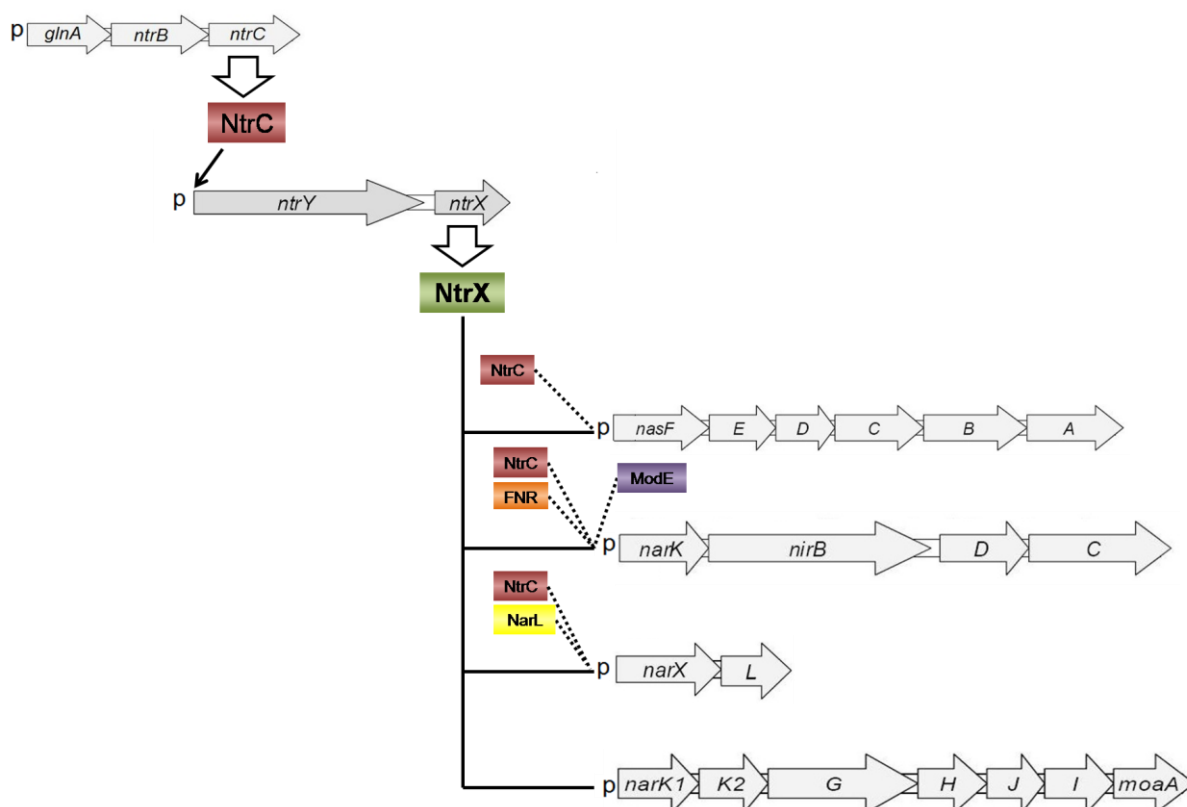


FIGURA 4 - MODELO DA CASCATA REGULATÓRIA DO METABOLISMO DE NITRATO EM *H. seropedicae*

NtrC está no início da cascata regulatória, ativando NtrY que, por sua vez, ativa a transcrição de genes do metabolismo de nitrato. Linhas sólidas indicam que a interação foi confirmada através de experimentos *in vitro* e/ou *in vivo*; linhas tracejadas, informação baseada em análise de sequência. Adaptado de Alves (2006) e Osaki (2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESTIRPE BACTERIANA E PLASMÍDEOS

A estirpe de bactéria e os plasmídeos utilizados estão listados na tabela 1.

TABELA 1 - ESTIRPE BACTERIANA E PLASMÍDEOS

Estirpe	Características	Referência
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F ⁻ <i>mcr</i> A Δ (<i>mrr-hsdRMS-crBC</i>) Φ80d <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1</i> <i>endA1 araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> <i>nupG</i>	Life Technologies
Plasmídeos	Características	Referência
pCR2.1- <i>narX</i>	Contém a região promotora do operon <i>narXL</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pCR2.1-TOPO (Amp ^R , Km ^R)	OSAKI (2009)
pCR2.1- <i>narK1K2 (int)</i>	Contém a região promotora do operon <i>narK1K2GHJI</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pCR2.1-TOPO (Amp ^R , Km ^R)	OSAKI (2009)
pCR2.1- <i>narK</i>	Contém a região promotora do operon <i>narKnirBDC</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pCR2.1-TOPO (Amp ^R , Km ^R)	OSAKI (2009)

3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

3.2.1 Meios de cultura

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas nos meios de cultura descritos abaixo, a 37°C, sob agitação. Estes meios foram esterilizados por autoclavação (a 120°C, a uma atmosfera de pressão, durante 20 minutos).

- **LB** (Luria Bertani) (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Composição	gramas/litro
extrato de levedura	5,0
NaCl	10,0
triptona	10,0

Para o preparo do meio LA (Luria-ágar) foi adicionado 1,5% de ágar no meio LB.

3.2.2 Antibióticos

Os antibióticos utilizados estão listados na tabela 2. As soluções estoque foram preparadas conforme Sambrook e colaboradores (1989) e armazenados a -20°C.

TABELA 2 - ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Abreviação	Concentração estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Ampicilina	Amp	250	250
Canamicina	Km	100	50

3.2.3 Estoque

As estirpes de *E. coli* foram mantidas em glicerol 50% a uma temperatura de -20°C.

3.3 MANIPULAÇÃO DE DNA

3.3.1 Extração de DNA plasmidial

Alíquotas de 1,5mL de células de *E. coli* saturadas foram coletadas e centrifugadas a 1000 g por um minuto. O pellet foi ressuspenso com a adição de 150µL de GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM; Tris HCl pH 8,0 25 mM). Para lise das células, foi acrescentado 150µL de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,18M), e, para neutralização do pH, 150µL de KacF (acetato de Potássio 3M, ácido fórmico 1,8M, pH 4,8). Após a incubação das células por 5 minutos no gelo, foi adicionado 50µL de fenol:clorofórmio:isoamílico (25:24:1). A mistura foi homogeneizada e centrifugada por cinco minutos a 14000 g. Foi coletado 450µL do sobrenadante, que foi transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com etanol, seco e ressuspenso em 20µL de água ultra pura.

3.3.2 Eletroforese em gel de agarose

Para análise de DNA foram utilizados géis de agarose (0,7 ou 1%) em tampão TBE 1x (Tris 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM). Os géis foram corados com brometo de etídio 0,5µg/mL e visualizados em transluminador de luz ultravioleta.

3.3.3 Marcação radioativa dos *primers*

O sistema de reação para marcação dos *primers* com ^{32}P , foi composto de tampão de reação, 1pmol de *primer*, 10U de polinucleotídeo quinase, 10µCi [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP e água ultra pura estéril para completar o volume final de 10µL. A reação foi incubada por cerca de 15 horas em temperatura ambiente. A enzima foi inativada a 70°C por 10 minutos.

3.3.4 AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para amplificar as regiões regulatórias dos operons *narXL*, *narKnirBDC* e *narK1K2GHJI* foram utilizados como molde os três plasmídeos descritos na tabela 1 e os *primers* complementares às extremidades do sítio de clonagem de pCR2.1, descritos abaixo:

Primer Universal 5' GTTGTAACGACGGCCAGT 3' (FAM (azul))

Primer Reverso 5' TTCACACAGGAAACAGCTATGAC 3' (VIC (verde))

O sistema de reação foi composto por 10 a 30ng/µL de DNA molde, 0,2µM de cada *primer* (ambos, apenas um ou nenhum deles marcado com fluoróforo), 0,3mM de dNTP, tampão de reação com KCl, 1,5U de Taq DNA polimerase, 1,5mM de cloreto de magnésio (Fermentas) e água ultra pura para completar o volume final de 50µL.

Os parâmetros utilizados para amplificar as regiões promotoras foram: um ciclo de três minutos a 94°C; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 60 segundos a 72°C; e um último ciclo de três minutos a 72°C.

Os produtos de PCR obtidos foram purificados com kit de extração de DNA (Fermentas), conforme recomendações do fabricante e, posteriormente, utilizados para o ensaio de retardamento de banda em gel, curva de DNase I e ensaio de *footprinting*.

3.4 DOSAGEM DE PROTEÍNA

Para estimar a concentração de proteína foi realizada dosagem de proteína conforme Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A concentração foi estimada considerando a proteína como um monômero.

3.5 ENSAIO DE RETARDAMENTO DE BANDA EM GEL

Amostras da proteína NtrX-His, purificadas por Osaki (2009) e armazenadas em tampão HEPES (HEPES 50mM pH8,0, NaCl 250mM, glicerol 50%), foram incubadas com os fragmentos de PCR marcados com fluoróforo (em ambas as fitas) ou com ^{32}P , durante 30 minutos, no gelo, em tampão TAP 1x (Tris acetato 50mM pH8,0, acetato de sódio 100mM, acetato de magnésio 8mM, acetato de amônio 27mM, DTT 1mM) com BSA 0,05µg/µL. Em seguida, as amostras foram misturadas com tampão de amostra (glicerol 50% e azul de bromofenol 0,001%) e aplicadas em gel de acrilamida não desnaturante 4%. O tampão de corrida utilizado foi o tampão nativo (Tris HCl 50mM, glicina 400mM, EDTA 2mM, sulfato de magnésio 8mM). O gel foi visualizado em transluminador de luz ultravioleta, no caso de DNA marcado com fluoróforo ou secado, exposto a um filme de raio X e escaneado no caso de DNA marcado radioativamente.

3.6 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE DNASE I

Para estabelecer a concentração de DNase I (Invitrogen) a ser utilizada no ensaio de *footprinting*, foi realizada uma curva de concentração, onde os fragmentos marcados com fluoróforo foram incubados em tampão TAP 1x com diferentes concentrações de DNase I (1:20, 1:50 e 1:100), previamente diluída em tampão de diluição (acetato de sódio pH 6,5 20mM, CaCl₂ 5mM, PMSF 0,1mM, glicerol 50%). Após dois minutos de reação a 30°C, as amostras foram tratadas com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e incubadas a 70°C por cinco minutos para inativação da enzima. Posteriormente, as amostras foram precipitadas com tRNA 10µg/mL, acetato de amônio 0,5 M e etanol.

A análise foi realizada no sequenciador de DNA ABI377 para averiguar a condição ideal de reação. A concentração de acrilamida do gel foi de 6%, com 7M de ureia. A temperatura de corrida foi de 50°C.

3.7 ENSAIO DE *FOOTPRINTING* COM DNASE I

NtrX-His foi incubada com carbamoil fosfato 10mM durante 10 minutos no gelo. Em seguida, a proteína foi misturada com os fragmentos marcados com fluoróforo em tampão TAP 1x durante 20 minutos, no gelo. Tampão HEPES também foi adicionado à reação para compensar seu efeito inibitório sobre a atividade da nuclease. DNase I foi adicionada na concentração estabelecida conforme item 3.6. As etapas de reação, precipitação e análise também foram realizadas de acordo com o item 3.6.

3.8 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA (USB)

As reações de seqüenciamento para marcação do sítio de ligação da NtrX foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante (USB). Aproximadamente 0,5µg do plasmídeo pCR2.1-*narX* foi incubado durante 10 minutos a 37°C com 2µl de NaOH 1M e 1pmol de *primer* universal FAM. Após

incubação rápida da reação no gelo, foi adicionado 2µl de HCl 1M para neutralização do pH, e 2µl de tampão “plasmid reaction buffer” e a reação foi novamente incubada a 37°C por 10 minutos, para anelamento do *primer*. A reação foi novamente resfriada no gelo. Após adição de DTT e sequenase, a reação foi dividida em quatro partes e transferida para tubos pré-aquecidos contendo misturas de A, G, C e T. A reação foi incubada por cerca de 8 minutos e interrompida com solução de parada.

As amostras foram analisadas no sequenciador de DNA ABI377.

4 RESULTADOS

4.1 ENSAIOS *IN VITRO* DE LIGAÇÃO DE NtrX NAS REGIÕES PROMOTORAS *narXL*, *narKnirBDC* e *narK1K2GHJI* de *H. seropedicae*

NtrX é uma proteína reguladora de resposta, da família de reguladores do sistema de dois componentes, que ativa a transcrição de vários genes do metabolismo do nitrato em conjunto com seu par sensor NtrY. NtrX de *H. seropedicae* apresenta massa molecular de 27,1 kDa e contém o domínio regulador de resposta na região N-terminal e o motivo hélice-volta-hélice no C-terminal. As proteínas NtrX e NtrY de *H. seropedicae* estão envolvidas com o metabolismo de nitrato, mas ao contrário de NtrX e NtrY de *A. caulinodans*, não regulam a fixação de nitrogênio (ALVES, 2006). O mecanismo de ativação da proteína NtrX não é conhecido, assim como o seu sítio de ligação ao DNA. Neste trabalho, foram realizados experimentos para identificar o sítio de ligação desta proteína ao DNA.

Para verificar a atividade de NtrX-His purificada por Osaki (2009) e armazenada em nitrogênio líquido, foram realizados ensaios de retardamento em gel, os quais mostram que a proteína estava ativa e, portanto, pôde ser utilizada para os demais ensaios *in vitro*. Além disso, foi possível confirmar que esta é capaz de se ligar às regiões promotoras dos operons *narXL* (FIGURA 5), *narK1K2GHJI* (FIGURA 6) e *narKnirBDC* (FIGURA 7), confirmando os dados de Osaki (2009).

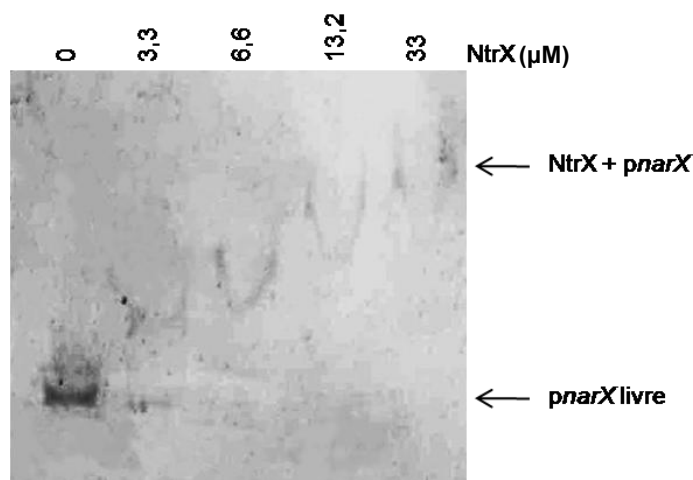


FIGURA 5 - ENSAIO DE RETARDAMENTO DE BANDA EM GEL DA REGIÃO PROMOTORA DO OPERON *narXL* DE *H. seropedicae*.

Concentrações crescentes de NtrX foram incubadas com fragmentos de DNA de 627pb contendo a região promotora do operon *narXL* marcada com fluoróforo nas duas extremidades, durante 20 minutos. As amostras foram resolvidas em gel de acrilamida não desnaturante 4%. FONTE: O autor.

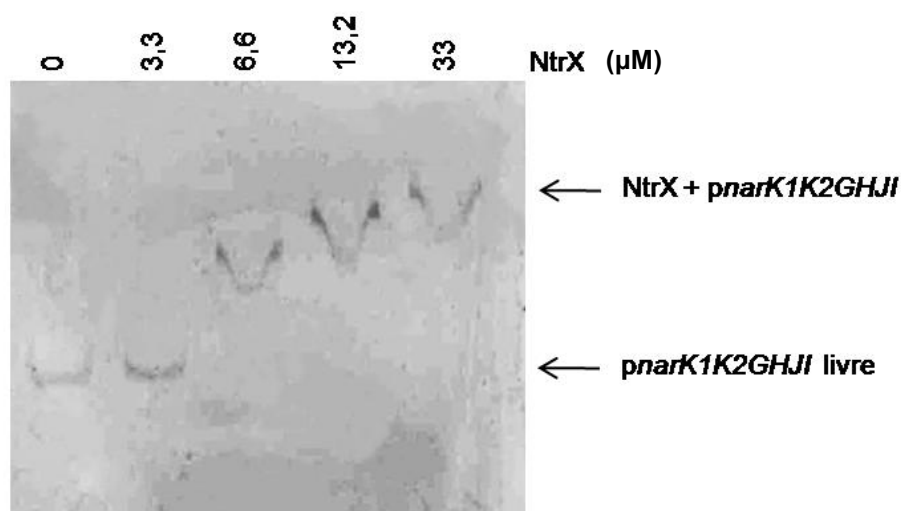


FIGURA 6 - ENSAIO DE RETARDAMENTO DE BANDA EM GEL DA REGIÃO PROMOTORA DO OPERON *narK1K2GHJI* DE *H. seropedicae*

Concentrações crescentes de NtrX foram incubadas com fragmentos de DNA de 932pb contendo a região promotora do operon *narK1K2GHJI* marcada com fluoróforo nas duas extremidades, durante 20 minutos. As amostras foram resolvidas em gel de acrilamida não desnaturante 4%. FONTE: O autor.

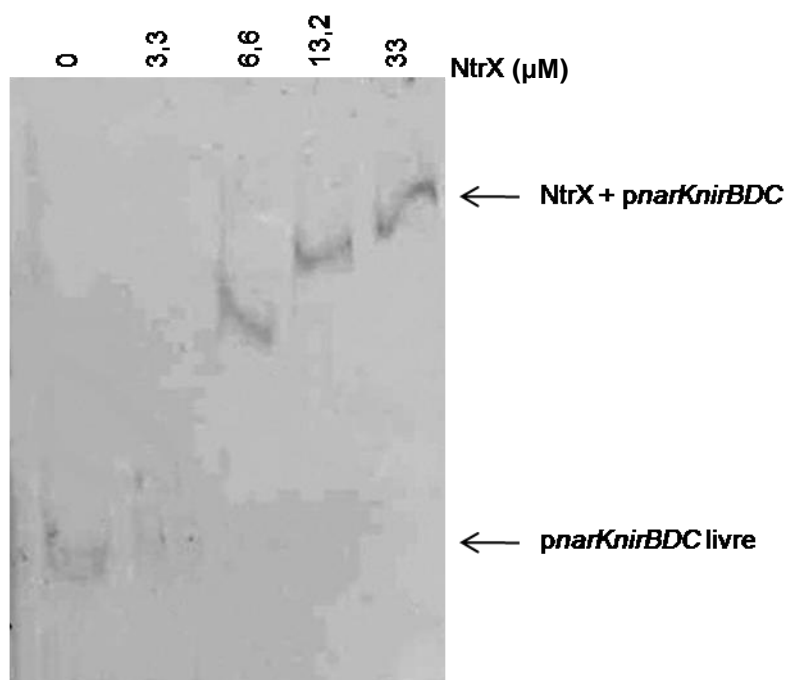


FIGURA 7 - ENSAIO DE RETARDAMENTO DE BANDA EM GEL DA REGIÃO PROMOTORA DO OPERON *narKnirBDC* DE *H. seropedicae*

Concentrações crescentes de NtrX foram incubadas com fragmentos de DNA de 540pb contendo a região promotora do operon *narKnirBDC* marcada com fluoróforo nas duas extremidades, durante 20 minutos. As amostras foram resolvidas em gel de acrilamida não desnaturante 4%. FONTE: O autor.

4.2 FOOTPRINTING COM DNASE I

A técnica de *footprinting* permite a identificação de sítios de ligação de proteínas a sequências específicas de DNA. O método mais comum utiliza radioatividade para marcação do DNA. Entretanto, devido a dificuldades de obtenção e manipulação de isótopos radioativos, um dos objetivos deste trabalho foi estabelecer condições para realizar ensaios de *footprinting* com DNase I utilizando DNA marcado com fluoróforo.

As regiões promotoras dos operons *narXL*, *narK1K2GHJI* e *narKnirBDC* foram amplificadas a partir dos plasmídeos descritos na seção Material e Métodos, utilizando *primers* com sonda marcada com fluoróforo (FAM e VIC).

Inicialmente, os produtos de PCR das regiões promotoras foram analisados no sequenciador de DNA para verificação da sensibilidade do equipamento. Foi necessário aumentar consideravelmente as quantidades de DNA para que ele pudesse ser detectado. Após determinação da quantidade de DNA a ser utilizada nas reações, a quantidade de DNase I necessária para produzir um padrão de clivagem do fragmento molde também foi definida através de curva de concentração de DNase I. A quantidade ideal de DNase I foi determinada em 0,05U por reação.

Em *footprinting* radioativos, apenas uma das fitas de DNA é marcada. O *footprinting* fluorescente permite a marcação das duas fitas simultaneamente através da utilização de um fluoróforo ligado a cada *primer* (ZIANNI *et al.*, 2006). Entretanto, neste caso a visualização do padrão de bandas ficou prejudicada devido à sobreposição de espectro de emissão dos fluoróforos utilizados (imagem não mostrada). Outra abordagem foi a realização do *footprinting* com marcação individual de cada fita de DNA dos moldes e com a proteína NtrX-His purificada por Osaki (2009). A figura 8 mostra os resultados obtidos com os moldes amplificados com o *primer* universal marcado com o fluoróforo FAM (azul). É possível visualizar bandas protegidas e hiper-reativas (círculos abertos e fechados, respectivamente) apenas nas reações com o molde *narX*.

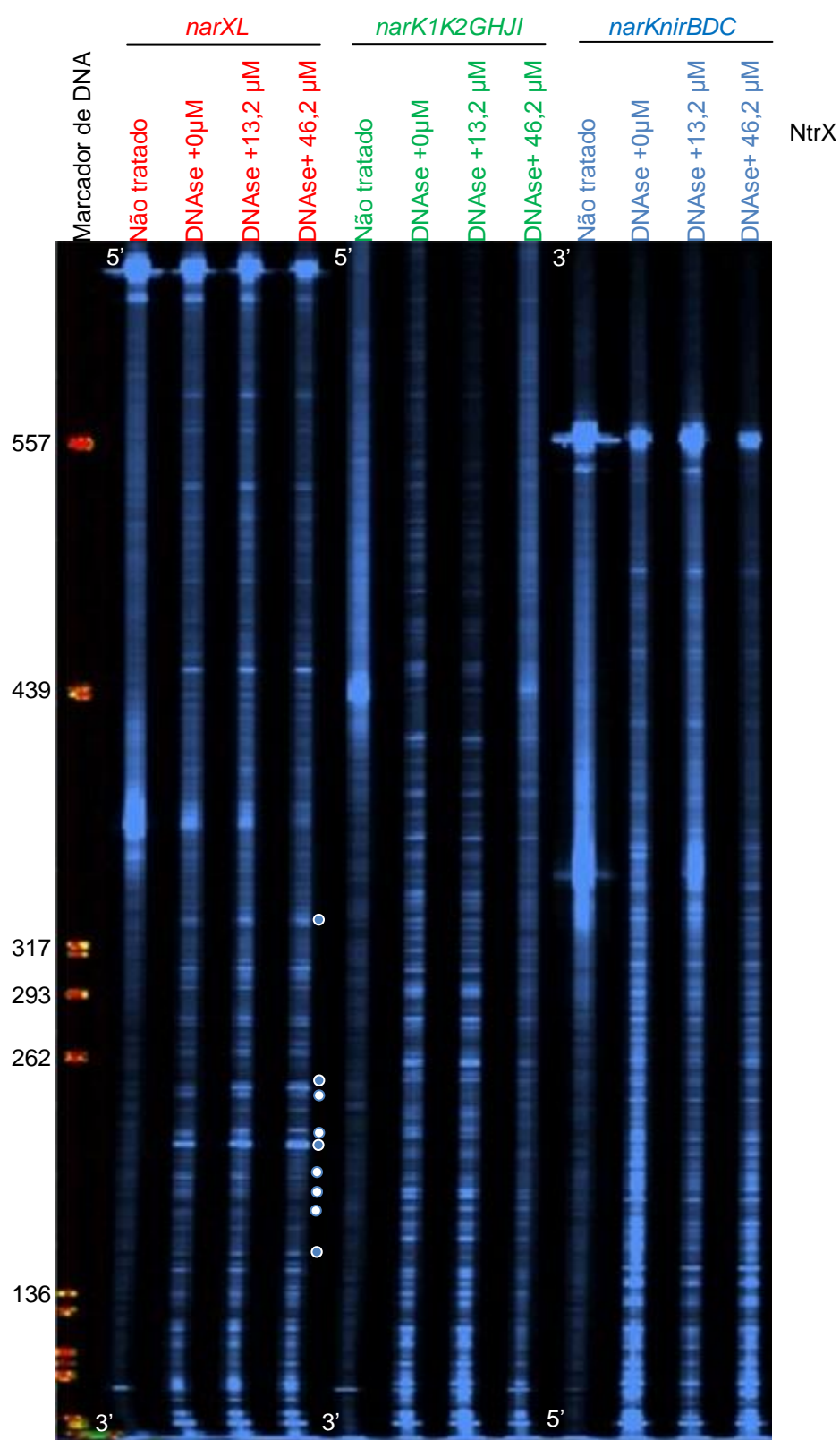


FIGURA 8 - FOOTPRINTING COM DNASE I DE NtrX COM OS MOLDES *narXL*, *narK1K2GHJI* E *narKnirBDC* DE *H. seropedicae* UTILIZANDO O PRIMER UNIVERSAL COM SONDA MARCADA COM FLUORÓFORO (FAM-AZUL)

Fragments de PCR foram digeridos com DNase I em diferentes concentrações de NtrX. Após purificação, os fragmentos de DNA foram separados em sequenciador de DNA. Círculos brancos e azuis indicam bandas protegidas e hiper-reativas, respectivamente. FONTE: O autor.

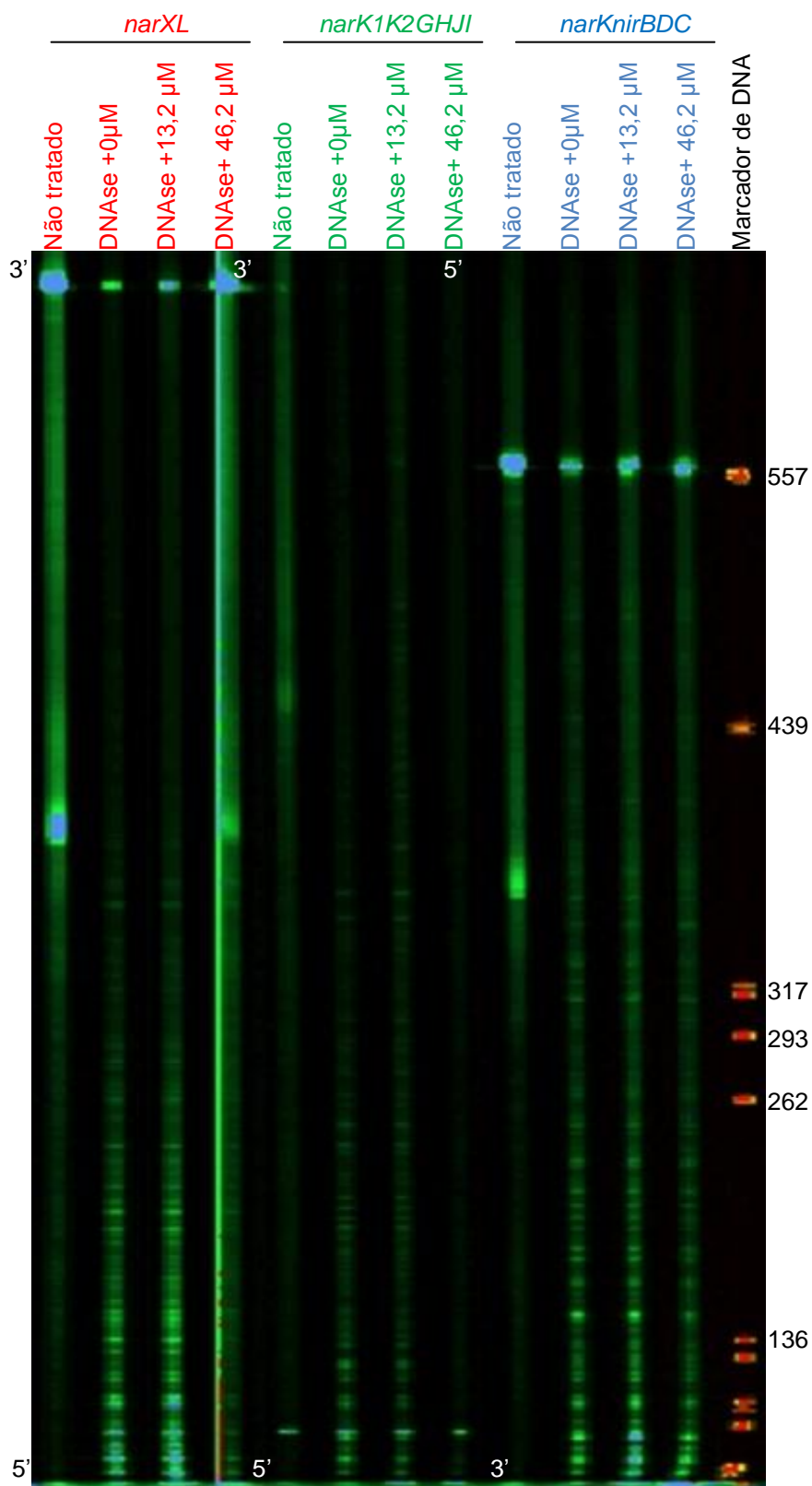


FIGURA 9 - FOOTPRINTING COM DNASE I DE NtrX COM OS MOLDES *narXL*, *narK1K2GHJI* E *narKnirBDC* DE *H. seropedicae* COM O PRIMER REVERSO COM SONDA MARCADA COM FLUORÓFORO (VIC-VERDE)

Fragmentsos de PCR foram digeridos com DNase I em diferentes concentrações de NtrX. Após purificação, os fragmentos de DNA foram separados em sequenciador de DNA. FONTE: O autor.

Para identificar quais bandas são protegidas ou hiper-reativas é essencial a comparação com reação de sequenciamento. Entretanto, neste caso, esta deve ser realizada com o mesmo *primer* marcado com fluoróforo utilizado para produzir os moldes. Com este objetivo, foi realizada uma reação de sequenciamento com a região promotora do operon *narXL* utilizando o *primer* universal FAM e o mesmo DNA molde. Contudo, não foi possível visualizar as bandas esperadas na reação de sequenciamento provavelmente devido a baixa sensibilidade e/ou eficácia na reação de sequenciamento. Com isso, apenas a posição aproximada do sítio de ligação ao DNA de NtrX foi avaliado com base no padrão de bandas do marcador de DNA “Gene Scan 1000 ROX size standard”. A região protegida do promotor de *narXL* está localizada entre as posições -150 pb e -100 pb do início de tradução do gene *narX*.

Os resultados obtidos para o *footprinting* com os moldes amplificados com *primers* reversos marcados com o fluoróforo VIC (verde) estão na figura 9. Não é possível observar *footprinting* em nenhum dos moldes, o que pode indicar que NtrX não protege esta fita de DNA.

4.3 FOOTPRINTING COM DNASE I UTILIZANDO MARCAÇÃO RADIOATIVA

Para confirmar os resultados obtidos com fluorescência, o molde *narXL* foi utilizado para reações de *footprinting* nas mesmas condições utilizadas no *footprinting* com fluorescência, exceto pela utilização dos *primers* NARX-for e NARX-rev (OSAKI, 2009) marcados com ^{32}P ao invés do reverso e universal com sonda marcada com fluoróforo.

Os resultados (FIGURA 10) confirmam os dados obtidos com fluorescência, onde NtrX protege apenas uma das fitas. O padrão de *footprinting* é mais evidente, mostrando que a marcação com ^{32}P é mais sensível que a marcação com fluoróforos. Para identificação correta das bases do DNA nas quais NtrX se liga, foi realizada uma reação de sequenciamento utilizando o *primer* NARX-for marcado com ^{32}P . Entretanto, conforme ocorreu anteriormente, a reação de sequenciamento ficou com uma qualidade baixa, não sendo possível identificar com precisão as bandas protegidas por NtrX.

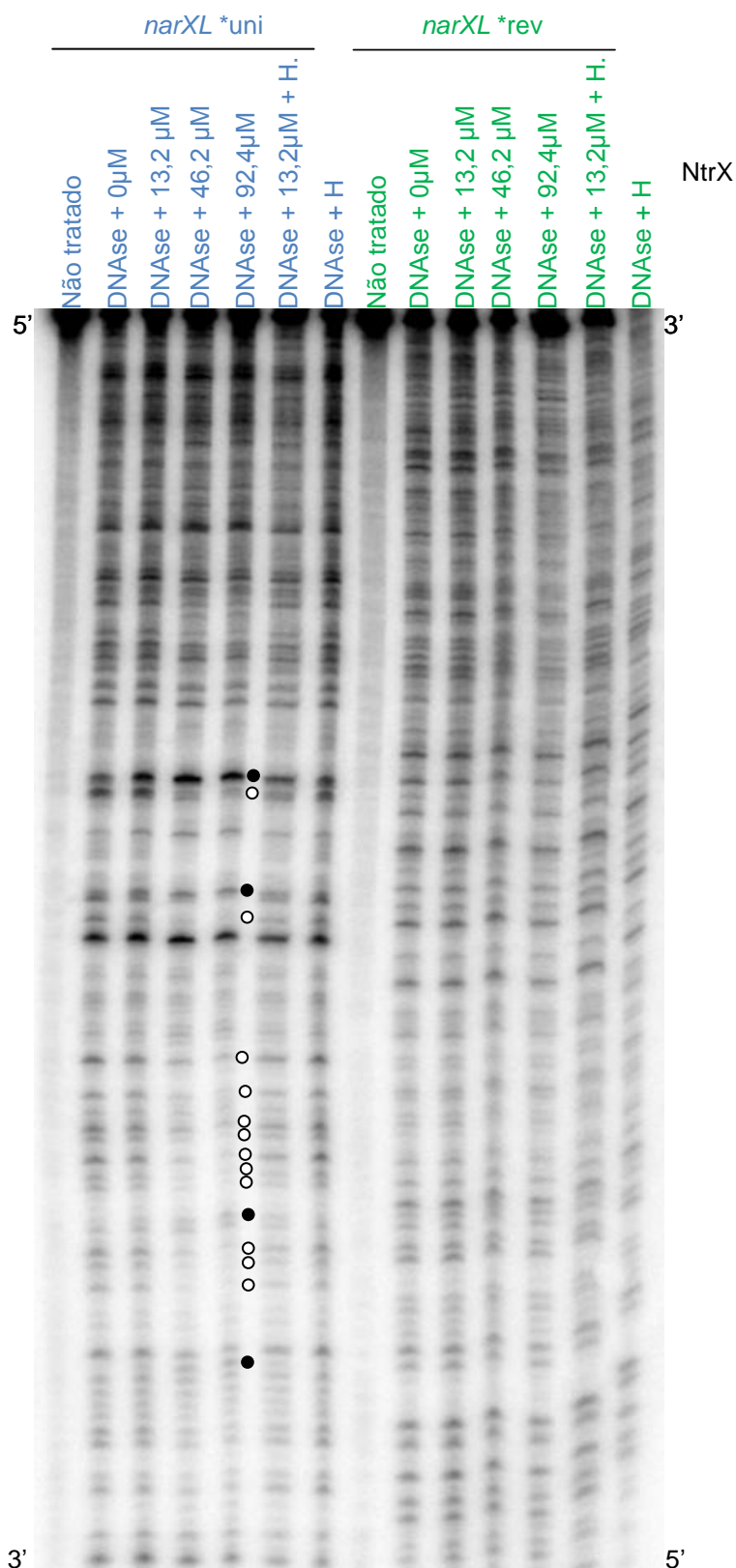


FIGURA 10 - FOOTPRINTING COM DNASE I DE NtrX COM O MOLDE *narXL* DE *H. seropedicae*, AMPLIFICADO COM OS PRIMERS NARX-FOR E NARX-REV MARCADOS COM ^{32}P

Fragmentos de PCR foram digeridos com DNase I em diferentes concentrações de NtrX. Após purificação, os fragmentos de DNA foram separados em sequenciador de DNA. H.: 10nM RNA polimerase holoenzima de *E. coli* (σ^{70}). FONTE: O autor.

4.4 INTERAÇÃO DE FATORES SIGMA COM A REGIÃO PROMOTORA DE *narXL*

A proteína NtrX de *H. seropedicae*, ao contrário de *A. caulinodans* e *A. brasilense*, não apresenta o domínio AAA de interação com a RNA polimerase- σ^{54} , muito comum em proteínas que regulam a transcrição através desse fator sigma. Isso sugere que NtrX de *H. seropedicae* ativa a transcrição através de outro fator sigma, mais provavelmente σ^{70} . Entretanto, análises da região regulatória não permitiram a identificação de uma boa sequência candidata a promotor dependente de σ^{70} . Uma sequência candidata foi escolhida, mas apresenta baixa similaridade com o consenso proposto para *E. coli* (TTGACA-N₁₇-TATAAT) (HAWLEY; MCCLURE, 1983) (FIGURA 11). Para testar se a RNA polimerase σ^{70} é capaz de se ligar a esta região foram realizados ensaios de retardamento de banda em gel. Nestes ensaios foram utilizados os fatores sigma σ^{54} e σ^{70} de *E. coli* e σ^{70} de *Rhizobium* sp. NGR234 (SigA), o qual é capaz de reconhecer eficientemente promotores de *H. seropedicae* (WASSEM, R.).

```

ccctgctgcgcgcgcgggatcgacgatgccggcctggagagcgccatccgcgcagcgatcgaa
ctgaagccggaacgccatgaattcaacgaggcgccacagaagatcgtgcgtttcatgtcaca
gacgggtggctagcggacttgcctgttgcagtttcccaggcttttctgctgcttttttaagaa
acattgacttggttccatacatgctggcaacgatgggcatagactgcctgtcggttcccgcc
ccgagtaccctcatggaccctgccgcgcgcgtcccttcgcgcgccttgccccgcacaagcgcct
gacttccgcatcctgctgatgaccctcatcggcctgggctgaccatgacggccatcggt
ataccctgctgctgtcctggcaattggaaggcggcggcaccgtcatcaatgaagcgggcagc
ctgcgcgatgcgctcctaccagctgggactggcgctggaaatgcaccagcgggacagtgcggt
gctgccggagatcgaacgtttcgaccagatcctgcgtagcctgcataccggccaaggcgacc

```

NarX

NARX for 5' tcgaactgaagccggaacgc 3'

NARX rev 5' atttccagcgccagttccag 3'

FIGURA 11 - SEQUÊNCIA DE DNA DA REGIÃO REGULATÓRIA DO OPERON *narXL* DE *H. seropedicae*

Em verde: possível sítio de ligação de σ^{54} . Em amarelo: possível sítio de ligação de σ^{70} . Em vermelho: região codificadora de *narX*. Em laranja: *primers* NARX for e NARX rev. Em azul: região codificadora de proteína hipotética conservada. FONTE: GENOPAR.

Apesar de não ter sido possível identificar um sítio de ligação para o fator sigma vegetativo na região promotora de *narXL* (ALVES, 2004), a RNA polimerase holoenzima σ^{70} de *E. coli* foi capaz de se ligar a esse molde, indicando que deve haver um sítio de ligação para este fator sigma (FIGURA 12). A análise de sequência da região regulatória permitiu a proposição de um promotor candidato que, apesar da baixa similaridade com o consenso, deve ser a sequência ativa (FIGURA 11). A RNA polimerase sem fator sigma ligou apenas fracamente ao molde, conforme esperado. O fator sigma σ^{70} de NGR234 (na ausência ou na presença de RNA polimerase) e o fator σ^{54} de *E. coli* também se ligaram apenas fracamente ao molde. Como previsto, a RNA polimerase associada ao fator sigma σ^{54} foi capaz de interagir com a região promotora de *narXL*, já que há um sítio de ligação a esse fator sigma. Na concentração testada, NtrX não se ligou ao molde. Para avaliar se a ligação das proteínas testadas à região promotora de *narXL* é específica foi realizado um ensaio nas mesmas condições descritas, exceto pela adição de DNA competidor heterólogo (0,5 μ g de DNA de timo bovino). O resultado (FIGURA 12) mostra que o DNA competidor não desestabilizou a ligação, indicando que a ligação de RNA polimerase e fatores sigma testados é específica.

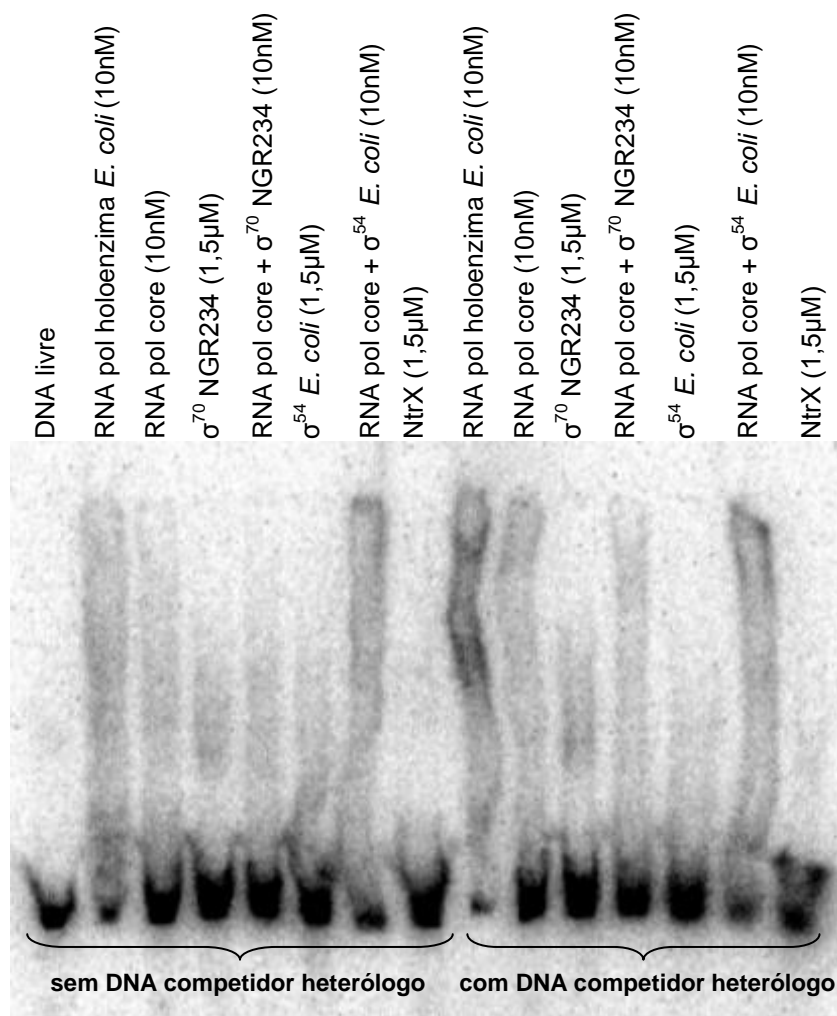


FIGURA 12 - ENSAIO DE RETARDAMENTO DE BANDA EM GEL DE *narXL* DE *H. seropedicae* INTERAGINDO COM FATORES SIGMA

Fragments de DNA com 419bp marcados com ^{32}P e contendo a região promotora do operon *narXL*, foram incubados com a RNA polimerase de *E. coli* e os fatores sigma σ^{54} e σ^{70} de *E. coli* ou σ^{70} de *Rhizobium* sp. NGR234, durante 20 minutos. Nas últimas reações foi utilizado DNA competidor heterólogo (0,5μg de DNA de timo). As amostras foram resolvidas em gel de acrilamida 4%. FONTE: O autor.

5 DISCUSSÃO

A técnica de *footprinting* começou a ser desenvolvida em 1978. Seqüenciadores de DNA fluorescentes foram introduzidos em 1986 e oito anos depois foram utilizados para a visualização de bandas de DNA protegidas com uma nuclease. No ano 2000, um analisador de DNA por eletroforese em capilar foi empregado para identificação de regiões de DNA protegidas e hiper-reativas. Em 2006, foi proposto um método que permite a identificação precisa das bases protegidas na digestão de DNA (revisto por ZIANNI *et al.*, 2006).

O *footprinting* fluorescente tem duas vantagens principais. A primeira delas é a corrida realizada em seqüenciadores de DNA automatizados, nos quais o resultado pode ser visualizado com maior rapidez. Outras vantagens são a disponibilidade de *primers* fluorescentes, a manipulação mais fácil e menores riscos durante a manipulação. A principal desvantagem é que o método fluorescente é menos sensível que a marcação radioativa (ZIANNI *et al.*, 2006).

No presente trabalho utilizamos a técnica de *footprinting* com DNase I, utilizando DNA molde com sonda marcada com fluoróforo para avaliar a capacidade da proteína NtrX de *H. seropedicae* de se ligar a regiões promotoras alvo.

A visualização de *footprinting* nos moldes *narK1K2GHJI* e *narKnirBDC* não foi possível e pode ter sido dificultada devido à posição do sítio em relação ao *primer*. Outra possibilidade é que, devido ao arraste de fundo (*background*) do DNA molde, as regiões protegidas ficaram mascaradas. Parte do DNA que não foi bem desnaturada também pode interferir na visualização das bandas. Este problema foi encontrado em reações de *footprinting* anteriores e mesmo a incubação das reações por 10 minutos a 99°C não foi capaz de desnaturar por completo o DNA, provavelmente devido à alta concentração deste nas reações.

As reações de *footprinting* obtidas com a região promotora de *narXL* sugerem que NtrX é capaz de se ligar ao DNA, entre -150pb a -100pb do início da região codificadora de *narX*. As reações de *footprinting* com material radioativo confirmaram os dados obtidos com fluorescência. Entretanto uma análise mais precisa sobre o sítio de interação de NtrX a seus sítios alvo não foi possível devido a baixa qualidade obtida nas reações de seqüenciamento. Para que a técnica de

footprinting fluorescente possa ser aplicada, devem ser testadas outras condições de reação de sequenciamento, que produzam uma quantidade muito maior de DNA, o qual deve ser visível no sequenciador.

Como NtrX não apresenta o domínio de interação com σ^{54} , foi sugerido que NtrX possa ativar a transcrição de seus promotores alvo através de σ^{70} (ALVES, 2004). Os ensaios de retardamento em gel confirmam que *narXL* apresenta sítio de ligação ao fator sigma σ^{54} , conforme previsto por Alves (2006) e indicam que o fator sigma σ^{70} também se liga a esta região, apesar de não haver um promotor candidato com alta similaridade ao consenso. Estes dados permitem a proposição de que NtrX pode interagir com a RNA polimerase- σ^{70} para ativar a transcrição de *narXL*.

Os dados *in vivo*, utilizando fusões com o gene *lacZ*, mostram que a transcrição de *narXL* é dependente de NtrC (ALVES, 2006). Entretanto, não há evidências de que NtrC ative diretamente este operon, uma vez que NtrYX, ativadores do operon *narXL*, são ativados por NtrC. Dessa forma, o efeito de NtrC pode ser indireto, mediado por NtrX. NtrC ativa transcrição através de interação com a RNA polimerase- σ^{54} , e seu sítio de ligação ao DNA pode estar distante do promotor, como é o caso de *narX*, que se encontra na posição -414 a -379 a montante da região codificadora (ALVES, 2006). Os ensaios de *footprinting* (FIGURAS 8, 9 e 10) mostraram que o sítio de ligação ao DNA de NtrX está muito próximo ao sítio de fator σ^{70} , característica muito comum em ativadores de transcrição dependentes deste fator sigma (BROWNING; BUSBY, 2004). Além disso, o sítio de ligação ao DNA de NtrX parece se sobrepor, pelo menos parcialmente, ao promotor dependente de σ^{54} . Com isso, quando NtrX está ligada em seu sítio na região promotora de *narXL*, impede a ativação deste operon por NtrC, criando um modelo onde NtrX ou NtrC ativam a transcrição de *narXL*, mas não ambas simultaneamente. A ativação por NtrC terá que ser confirmada experimentalmente. Se não for confirmada, outro ativador pode regular esta região, uma vez que esta contém um promotor dependente de σ^{54} funcional.

6 CONCLUSÕES

- O sítio de interação de NtrX em *narXL* localiza-se entre as bases -150 pb e -100 pb a partir do início da região codificadora de *narX*.
- Não foi possível identificar o sítio de ligação de NtrX em *narK1K2GHJI* e *narKnirBDC*.
- O *footprinting* utilizando DNA marcado com fluoróforo é um bom método para análise de sítios de ligação de proteínas ao DNA, mas requer maiores quantidades de DNA molde.
- A região promotora de *narXL* contém um provável sítio de interação com RNA polimerase σ^{70} , o que sugere que NtrX possa ativar a transcrição do operon através desse fator sigma.
- A sequência promotora dependente de σ^{54} observada na região promotora de *narXL* é reconhecida pela RNA polimerase- σ^{54} .

REFERÊNCIAS

ALVES, L. R. **Caracterização dos genes *ntrY* e *ntrX* de *Herbaspirillum seropedicae***. 50 p. Monografia (Departamento de Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

ALVES, L. R. **Envolvimento do gene *ntrY* no metabolismo de nitrato em *Herbaspirillum seropedicae***. 83 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ARAVIND, L.; PONTING, C. P. The cytoplasmatic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 176, n. 1, p. 111-116, 1999.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SAMPAIO, M. J. A. M.; DOBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 56, n.3, p. 365, 1984.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86-93, Jan. 1986.

BLASCO, F.; SANTOS, J.-P. dos; MAGALON, A.; FRIXON, C.; GUIGLIARELLI, B.; SANTINI, C.-L.; GIORDANO, G. NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 435-447, Jan. 1998.

BLASCO, F.; GUIGLIARELLI, B.; MAGALON, A.; ASSO, M.; GIORDANO, G.; ROTHERY, R. A. The coordination and function of the redox centres of the membrane-bound nitrate reductases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 2, p. 179-193, Feb. 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilization the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, May 1976.

BROWNING, D. F.; BUSBY, S. J. W. The regulation of bacterial transcription initiation. **Nature**, v. 2, p. 1-9, Jan 2004.

CAPELA, D. *et al.* Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 17, p. 9877-9882, Aug. 2001.

CHENG, Q. Perspectives in biological nitrogen fixation research. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 7, p. 786-798, July 2008.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M. de; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, H.; PEDROSA, F. de O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) e pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2375-2379, May 2001.

DARWIN, A. J.; STEWART, V. Expression of the *narX*, *narL*, *narP* and *narQ* genes of *Escherichia coli* K-12: regulation of the regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 13, p. 3865-3869, July 1995.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature**, v. 2, p.621-631, Aug. 2004.

FALK, E. C.; JOHNSON, J. L.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J.; KRIEG, N. R. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. **Journal of the International Committee on Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 80-85, 1986.

GOLDMAN, B. S.; LIN, J. T.; STEWART, V. Identification and structure of the *nasR* gene encoding a nitrate- and nitrite-responsive positive regulator of *nasFEDCBA* (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 16, p. 5077-5085, Aug. 1994.

HAWLEY, D. K.; MCCLURE, W. R. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 11, n. 8, p. 2237-2255, 1983.

ISHIDA, M. L.; ASSUMPCAO, M. C.; MACHADO, H. B.; BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v.35, p. 651-661, June 2002.

KANEKO, T. *et al.* Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti* (Supplement). **DNA Research**, v. 7, p. 381-406, 2000.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; FUNAYMA, S.; RIGO, L. U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p. 887-891, 1997.

KLOTZ, M. G.; STEIN, L. Y. Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 2, p. 146-156, Jan. 2008.

LIN, J. T.; GOLDMAN, B. S.; STEWART, V. Structures of genes *nasA* and *nasB*, encoding assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Klebsiella pneumonia* M5al. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 8, p. 2370-2378, Apr. 1993.

LIN, J. T.; GOLDMAN, B. S.; STEWART, V. The *nasFEDCBA* operon for nitrate and nitrite assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5al. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 9, p. 2551-2559, May 1994.

LIN, J. T.; STEWART, V. Nitrate and nitrite-mediated transcription antitermination control of *nasF* (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumonia* M5al. **Journal of Molecular Biology**, v. 256, p. 423-435, 1996.

LIU, X.; DEMOSS, J. A. Characterization of NarJ, a system-specific chaperone required for nitrate reductase biogenesis in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 39, Sep. 1997.

MARGER, M.D.; SAIER, M.H. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 18, n. 1, p.13-20, Jan. 1993.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 9, p. 604-622, Dec. 1995.

MIKAMI, B.; IDA, S. Purification and properties of ferredoxin-nitrate reductase from the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 791, n. 33, p. 294-304, 1984.

MOIR, J. W., WOOD, N. J. Nitrate and nitrite transport in bacteria. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 2, p. 215-224, Feb. 2001.

MORENO-VIVIÁN, C.; CABELLO, P.; MARTÍNEZ-LUQUE, M.; BLASCO, R.; CASTILLO, F. Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 21, Nov. 1999.

MOROZKINA, E. V.; ZVYAGILSKAYA, R. A. Nitrate reductases: structure, functions, and effect of stress factors. **Biochemistry**, Moscow, v. 72, n. 10, p. 1151-1160, Oct. 2007.

NAKANO, M. M.; YANG, F. HARDIN, P.; ZUBER, P. Nitrogen regulation of *nasA* and the *nasB* operon, which encode genes required for nitrate assimilation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 3, p. 573-579, Feb. 1995.

NAKANO, M. M.; HOFFMANN, T.; ZHU, Y.; JAHN, D. Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis nasDEF* encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 20, p. 5344-5350, Oct. 1998.

NIERMAN, W. C. *et al.* Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 7, p. 4136-4141, Mar. 2001.

NOJI, S.; NOHNO, T.; SAITO, T.; TANIGUCHI, S. The *nark* gene product participates in nitrate transport induced in *Escherichia coli* nitrate-respiring cells. **FEB Letters**, v. 252, n. 1, p. 139-143, July 1989.

OGAWA, R.-I.; AKAGAWA, E.; YAMANE, K.; SUN, Z.-W.; LaCELLE, M.; ZUBER, P.; NAKANO, M. M. The *nasB* operon and *nasA* gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 5, p. 1409-1413, Mar. 1995.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology Fertility of Soils**, v. 21, p. 197-200, Feb. 1996.

OSAKI, J. H. **Caracterização funcional da proteína NtrX de *Herbaspirillum seropedicae***. 82p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PAWLOWSKI, K.; KLOSSE, U.; de BRUIJN, F. J. Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. **Mol. Gen. Genet.**, v. 231, p. 124-138, Dec.1991.

PHILIPPOT, L.; HOJBERG, O. Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1446, p. 1-23, May 1999.

RABIN, R. S.; STEWART, V. Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 11, p. 3259-3268, June 1993.

RICHARDSON, D. J.; BERKS, B. C.; RUSSEL, D. A.; SPIRO, S.; TAYLOR, C. J. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 2, p. 165-178, Feb. 2001.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* express *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 39-47, 2003.

RUBIO, L. M.; FLORES, E. HERRERO, A. Molybdopterin guanine dinucleotide cofactor in *Synechococcus* sp. nitrate reductase: identification of *mobA* and isolation of a putative *moeB* gene. **FEBS Letters**, v. 462, n. 3, p. 358-362, Dec. 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SELF, W. T.; GRUNDEN, A. M.; HASONA, A.; SHANMUGAM, K. T. Transcriptional regulation of molybdoenzyme synthesis in *Escherichia coli* in response to molybdenum: ModE-molybdate, a repressor of the *modABCD* (molybdate transport) operon is a secondary transcriptional activator for the *hyc* and *nar* operons. **Microbiology**, v. 145, p. 41-55, 1999.

SHARMA, V.; NORIEGA, C. E.; ROWE, J. J. Involvement of NarK1 and NarK2 proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 695-701, Jan. 2006.

STOCK, A. M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU, P. N. Two-component signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 183-215, 2000.

SZURMANT, H.; WHITE, R. A.; HOCH, J. H. Sensor complexes regulating two-component signal transduction. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, n. 6, p. 706-715, Dec. 2007.

TAYLOR, B. L.; ZHULIN, I. B. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 2, p. 479-506, June 1999.

TETTELIN, H.; SAUNDERS, N. J.; HEIDELBERG, J., *et al.* Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. **Science**, v. 287, p. 1809-1815, 2000.

WEST, A. H.; STOCK, A. M. Histidine kinase and response regulator proteins in two-component signaling systems. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 6, p. 369-376, June 2001.

WU, Q.; STEWART, V. NasFED proteins mediate assimilatory nitrate and nitrite transport in *Klebsiella oxytoca* (*pneumoniae*) M5al. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 5, p. 1311-1322, Mar. 1998.

WU, S. Q.; CHAI, W.; LIN, J. T.; STEWART, V. General nitrogen regulation of nitrate assimilation regulatory gene *nasR* expression in *Klebsiella oxytoca* M5al. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 23, p. 7274-7284, Dec. 1999.

ZIANNI, M.; TESSANNE, K.; MERIGHI, M.; LAGUNA, R.; TABITA, F. R. Identification of the DNA bases of a DNase I footprinting by the use of dye primer sequencing on an automated capillary DNA analysis instrument. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 17, p. 103-113, Apr. 2006